

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl.

C07K 14/52

C07K 14/54 A61K 38/20

A61P 7/00 A61P 1/14

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99123759.5

[43]公开日 2000年8月30日

[11]公开号 CN 1264709A

[22]申请日 1999.11.19 [21]申请号 99123759.5

[71]申请人 重庆多泰制药有限公司

地址 400060 重庆市南坪南四路中段范开

[72]发明人 范开 聂李亚 马聚永 黄洪涛

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 N 端 1 至 9 位氨基酸缺失的人白细胞介素 11 衍生物

[57]摘要

利用基因工程手段对人白细胞介素 11 进行改造,制备出的衍生物证明具有各种生物功能。本发明的比人天然白细胞介素 11N 末端缺失 9 个氨基酸,且在缺失后的第一个氨基酸进行同源替换的衍生物  $\Delta 1-9$  人白细胞介素 11,具有潜在的药物开发价值。

ISSN 1000-8427

知识产权出版社出版

1.  $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物, 是在天然人白细胞介素 11 N 末端缺失 9 个氨基酸的基础上, 缺失后的第一个氨基酸进行替换后形成的衍生物。
2. 条款 1 中缺失后的第一个氨基酸替换是将人白细胞介素在相应位置上的氨基酸 Valine 用其它氨基酸进行替换。
3. 条款 2 中的替换氨基酸主要是 Ala、Gly、Leu、Pro、Thr、Met、Ser, 其它氨基酸也同样适用。
4. 条款 1、2 中的缺失和替换是应用基因工程技术的方法。
5. 条款 1、2 中的  $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物可以是重组形式和人工合成形式。
6. 条款 5 中的重组形式适用于原核和真核表达体系, 以及转基因动植物体系来完成。
7. 条款 5 中的人工合成形式适用于蛋白多肽的自动合成和手工非自动合成方法来完成。
8. 条款 1、2 中的  $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物具有白细胞介素 11 相应的生物学功效。
9. 条款 1、2 中的  $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物具有治疗和预防疾病的功效, 主要指血小板减少症、白细胞减少症和胃肠粘膜保护等。
10. 条款 8、9 中的生物功效和药用功效具有药物和非药物价值。
11. 条款 10 中的药物价值指各种剂型的药品。
12. 条款 10 中的非药物价值指各种形式的商业产品。

## N 端 1 至 9 位氨基酸缺失的人白细胞介素 11 衍生物

已经证明和发现在免疫系统和造血系统中起调节作用的蛋白质有数十种，它们统称为细胞因子，如集落刺激因子、白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子等。这些细胞因子具有广泛的靶细胞，包括骨髓细胞、外周血细胞、胎肝细胞、淋巴细胞等。由于细胞因子的自然来源十分有限，应用基因工程手段进行基因克隆、重组表达和高效的纯化，是目前众多细胞因子在基础研究和临床应用上的重要手段。

人白细胞介素 11 (interleukin-11, IL-11)是具有多种生物功能的蛋白。已经证实的主要作用有刺激巨核细胞增生，增加血小板数量，促进 B 细胞的发育和功能，保护粘膜细胞受损。天然成熟人白细胞介素 11 由 178 个氨基酸组成，分子量为 20KD，是强碱性蛋白 (pI 11.7)，疏水性强。人 IL-11 基因全长 1100 对碱基，其中 5' 端有 72 个碱基非编码区，3' 端有 431 个碱基非编码区。阅读框架为 597 个碱基，翻译表达为 199 个氨基酸组成的人白细胞介素 11 蛋白，其中 N 末端 1-21 个氨基酸是信号肽序列，故天然活性的人白细胞介素 11 N 末端为 Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Arg Ala Ser Pro Asp 等。猴和鼠的白细胞介素 11 基因已被克隆和重组表达成功。人和猴的白细胞介素 11 在氨基酸和碱基序列方面有极高的同源性，其中氨基酸序列同源性 93.7%，碱基序列同源性 99.5%。

应用基因工程手段进行天然细胞因子的重组表达以及改造已成为一种重要手段。基因工程的改造主要包括基因的缺失、突变和融合，从而可以制备出各种形式的衍生物。改造的目的除了要进行蛋白的结构与功能研究外，在提高蛋白的生物功能和减少体内毒副作用方面，更具有药物开发价值。我们曾发明了一种应用基因工程重组手段对人白细胞介素 11 进行 N 末端改造的方法 (专利申请号: CN 99111463.9)，形成在人白细胞介素 11 的 N 末端缺失 5 个氨基酸的基础上，对第 7 个和第 10 位氨基酸进行替换成猴在相对应氨基酸位置上的改造型。在前面专利的基础上，本专利发明了 N 端 1 至 9 位氨基酸缺失的人白细胞介素 11 衍生物的改造和制备方法。N 端 1 至 9 位氨基酸缺失的人白细胞介素 11 是在人白细胞介素的 N 末端缺失 9 个氨基酸的基础上，并对第一个氨基酸进行替换而成的新型衍生物。人白细胞介素 11 的 N 末端 9 个氨基酸的缺失和第 10 位氨基酸的替换主要采用基因工程技术，然后用重组表达形式经分离纯化而得。重组形式的 N 端 1 至 9 位氨基酸缺失的人白细胞介素 11 衍生物经体内外试验证明具有天然人白细胞介素 11 相同的生物活性和功能，且在动物实验中发现了有比天然人白细胞介素 11 所不具有的特点。在猕猴卡铂化疗模型中除了促进外周血小板数目外，还具有升高中性粒细胞的功能。在动物代谢试验中，发现 N 端 1 至 9 位氨基酸缺失的人白细胞介素 11 衍生物在胃肠粘膜组织中的分布更强。在动物实验中发现和证明的这些特点具有极大的药用价值。

由于人白细胞介素 11 蛋白的特殊性,在大肠杆菌体系中需采用融合蛋白的表达形式来进行。根据不同表达质粒体系和融合蛋白切开的特点,在天然人白细胞介素 11 的 N 末端缺失 9 个以后的第一个氨基酸应不同,即天然人白细胞介素 11 的第 10 位氨基酸将被替换。在本专利实例说明中采用谷胱甘肽转硫酶 (GST) 作为融合蛋白,用凝血酶切开融合蛋白后形成的 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物在 N 末端的第一个氨基酸被换成丙氨酸。选择丙氨酸的依据是根据前面专利 (CN: 99111463.9) 所述,在此位置人和猴的氨基酸有差异,即人为缬氨酸,猴为丙氨酸。这种 Val 到 Ala 的替换更合理。由于凝血酶识别位点的特异性是 X1-X2-Pro-Arg-X3-X4, X1, X2 是疏水氨基酸, X3, X4 是非酸性氨基酸。在本方法中 X1, X2 的要求不会影响 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物的制备, X3, X4 因凝血酶切开后将是 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 的前二个氨基酸,因此具有较大的选择性。本专利的衍生物只涉及缺失后的第一个氨基酸的替换,因此 X4 应为人白细胞介素 11 相应位置的氨基酸即 Ser。X3 虽然具有较大的选择性,我们研究发现首选序列是 Ala-Gly-Leu-Pro-Thr-Met-Ser。这几种氨基酸作为 X3,凝血酶均能有效的切开 Arg 后的肽键。应用本专利实例中的原理,可以用非凝血酶的方法来切开融合蛋白制备出 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物,也可以用非 GST (谷胱甘肽转硫酶) 作为融合蛋白的质粒表达系统来制备出 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物。

由于基因工程技术的进步,新的原核表达体系、酵母表达体系、昆虫表达体系、哺乳动物细胞表达体系、转基因动物表达体系、转基因植物表达体系制备重组蛋白的方法越来越多。本专利中所述 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物同时可以在这些体系中重组表达。由于蛋白合成技术的进步,应用蛋白多肽自动合成仪或人工蛋白多肽合成方法同样可以制备出本专利所述的 $\Delta$ 1-9 人白细胞介素 11 衍生物。

## 实例说明 I

一. 重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物融合表达系统的构建和测序

选用含谷胱甘肽转硫酶 (GST) 的融合表达质粒 pGEX-4T-1 (Pharmacia) 作为构建的载体, 此载体含有凝血酶位点。根据人和猴的白细胞介素 11 的 cDNA 序列, 以及新型改进型人白细胞介素 11 即 N 末端缺失 5 个氨基酸, N 末端第 7 位和第 10 位氨基酸改为猴的 Ser 和 Ala 的要求, 设计两对 PCR 引物, 即正链: 5' -CT GGA TCC CCT CGA GCT TCC CCA GAC CCT CGG-3', 反链 5' -TTA TCA CAG CCG AGT CTT CAG CAG CAG TAG CCC-3'。以人的白细胞介素 11 全基因 cDNA 为模板, 扩增出的改进型人白细胞介素 11 基因片段与酶切后的 pGEX-4T-1 大片段相连, 转化大肠杆菌 JM105, 筛选出含插入片段的重组子命名为 pGEX-FK-11a (图 1), 经序列分析后可进行融合表达研究。

从 pGEX-FK-11 中用 BamH I 和 Sal I 双酶切下新型改进型人白介素 11 基因片段, 与 pUC-19 经 BamH I 和 Sal I 双酶切后的大片段相连, 用蓝白斑法筛选出重组子, 命名为 pUC-FK-11a。经 AB I 全自动基因测序后得到插入的新型人白介素 11 的基因序列以及相对应的氨基酸序列, 结果分析与设计的完全一致。

二. 重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物的重组表达和制备

含新型改进型人白细胞介素 11 基因的 pGEX-FK-11a 转化大肠杆菌 JM105, 在含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中摇瓶过夜 (37 $^{\circ}$ C, 200rpm), 再按 1:30 接种含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 小时后, 加入 0.5mM IPTG 诱导 4 小时。收集菌体经 SDS-PAGE 电泳分析, 发现含新型人白细胞介素 11 的融合蛋白 GST-FK-11a (44.6KD) 以可溶性表达为主, 表达量占菌体总蛋白的 28%。

用 1000ml 发酵液, 离心收集菌体约 15 克, 用 50 mM 磷酸缓冲液 (pH7.8) 含 1% Triton 溶液混悬菌体, 在室温下破菌 20 分钟, 破菌液经超声波处理至无粘稠后离心去沉淀。上清经 Glutathion-Sepharose (Pharmacia) 进行亲和层析纯化, 吸附在柱上的含新型人白细胞介素 11 的融合蛋白, 用人血浆凝血酶 (每毫升含用 5NIH 单位凝血酶) 室温下在位酶切 1 小时。酶切下的重组新型人白细胞介素 11 再经 CM-Sepharose CL-4B 纯化, 最终产物的纯度超过 98%, 热原含量每 mg 蛋白低于 10EU 内毒素。

三. 重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物的理化性质和生物活性

本方法制备的重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物分子量为 18.2 KD, 等电点大于 10.0, 紫外最大吸收峰为 281nm, 溴化氰肽图分析含有二个甲硫氨酸。氨基酸组成分析与理论设计值一致, 由 169 个氨基酸组成, 其中无半胱氨酸。N 末端测序证实是: Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu。与设计的重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物 N 末端序列完全一致。

用依赖于白细胞介素 6 的细胞株 7TD1 和 B911 的 MTT 方法测活, 参照品是美国 Genetics Institute 的缺失脯氨酸的重组人白细胞介素 11 和天然的人白细胞介素 11。测得本方法制备的重组人  $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>) 白细胞介素 11 衍生物的比活性分别是  $2.5 \times 10^6$  IU/mg (7TD1 细胞) 和  $8.0 \times 10^6$  IU/mg (B911 细胞), 与天然和缺失脯氨酸的人白细胞介素 11 的比活性完全一致。

四. 重组人  $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>) 白细胞介素 11 衍生物增加猕猴外周血血小板和白细胞的数量

猕猴静脉注射卡铂 15mg/kg/day, 连续 3 天, 在第三次注射后 18 小时内 sc  $\Delta 1-9$  (ala) 人白细胞介素 11 衍生物, 分二个剂量组, 1 次/日, 连续给药 14 天。表 (1) 示重组人  $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>) 白细胞介素 11 衍生物 50  $\mu$  KD 和 100  $\mu$  KD 均能明显提高猕猴外周血血小板数量, 与 neumega (美国 GI 公司上市重组人白细胞介素 11) 100  $\mu$  KD 效果完全一致。

表 (1)  $\Delta 1-9$  (Ala)<sup>10</sup> 人白细胞介素 11 衍生物对注射卡铂猕猴血小板计数的影响

时 间 (天)	血 小 板 计 数 ( $10^9/L$ )			
	模型对照组	50 $\mu$ KD 组	100 $\mu$ KD 组	neumega(100 $\mu$ KD)
给药前	396.9 $\pm$ 90.9	397.1 $\pm$ 98.8	379.1 $\pm$ 79.0	397.8 $\pm$ 38.8
给药 1 天	420.8 $\pm$ 93.2	398.0 $\pm$ 131.9	320.0 $\pm$ 62.9	346.5 $\pm$ 28.9
3 天	385.2 $\pm$ 104.6	398.5 $\pm$ 21.2	426.3 $\pm$ 65.6	444.0 $\pm$ 27.4
5 天	340.8 $\pm$ 78.2	368.3 $\pm$ 88.3	416.5 $\pm$ 110.6	583.3 $\pm$ 184.7*
7 天	188.3 $\pm$ 54.6	222.8 $\pm$ 140.9	535.0 $\pm$ 134.4**	477.8 $\pm$ 274.5
9 天	98.0 $\pm$ 70.8	293.8 $\pm$ 131.3*	476.8 $\pm$ 167.7**	491.3 $\pm$ 301.7*
11 天	77.3 $\pm$ 35.2	455.3 $\pm$ 172.1**	407.3 $\pm$ 149.2**	513.5 $\pm$ 249.4*
13 天	215.0 $\pm$ 48.2	409.8 $\pm$ 144.3*	399.5 $\pm$ 36.4***	300.0 $\pm$ 192.2
停药 1 天	416.5 $\pm$ 108.9	609.5 $\pm$ 155.2	521.3 $\pm$ 116.6	506.3 $\pm$ 73.4
3 天	740.0 $\pm$ 118.6	951.5 $\pm$ 221.6	584.5 $\pm$ 84.8	723.5 $\pm$ 193.2
5 天	755.5 $\pm$ 59.8	975.3 $\pm$ 152.5*	687.3 $\pm$ 119.8	856.5 $\pm$ 283.6
7 天	720.3 $\pm$ 15.7	959.8 $\pm$ 128.1**	670.3 $\pm$ 140.4	865.8 $\pm$ 129.1
9 天	584.5 $\pm$ 21.3	983.5 $\pm$ 57.2***	812.8 $\pm$ 209.4	781.0 $\pm$ 113.9**
11 天	525.3 $\pm$ 56.9	901.0 $\pm$ 105.6***	743.0 $\pm$ 89.4**	874.3 $\pm$ 61.6***
13 天	413.0 $\pm$ 43.3	593.5 $\pm$ 38.2***	594.0 $\pm$ 95.7*	628.0 $\pm$ 112.3*
15 天	352.5 $\pm$ 23.8	608.3 $\pm$ 124.0**	510.5 $\pm$ 108.3*	472.3 $\pm$ 62.9*

注: neumega 为美国 Genetics Institute 的已上市重组人白细胞介素 11

n=4. 与模型对照组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

与小剂量组相比较, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.01

表(2)示重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物 50  $\mu$  KD 和 100  $\mu$  KD 均能明显提高猕猴外周血白细胞总数, 而 neumega (美国 GI 公司上市的重组人白细胞介素 11) 100  $\mu$  KD 对猕猴外周血白细胞总数的增加效果不显著。

表(2)  $\Delta 1-9$  (Ala)<sup>10</sup> 人白细胞介素 11 衍生物对注射卡铂猕猴白细胞总数的影响

时 间 (天)	白 细 胞 总 数 ( $10^9/L$ )			
	模型对照组	50 $\mu$ KD 组	100 $\mu$ KD 组	neumega(100 $\mu$ KD)
给药前	12.1 $\pm$ 5.9	10.3 $\pm$ 0.8	10.9 $\pm$ 2.6	11.9 $\pm$ 1.6
给药 1 天	11.5 $\pm$ 9.4	10.8 $\pm$ 3.8	15.3 $\pm$ 5.8	12.1 $\pm$ 3.6
3 天	10.3 $\pm$ 3.0	9.2 $\pm$ 5.1	6.5 $\pm$ 2.4	8.6 $\pm$ 1.4
5 天	7.2 $\pm$ 3.3	6.9 $\pm$ 5.4	11.4 $\pm$ 6.4	10.1 $\pm$ 2.3
7 天	6.4 $\pm$ 2.9	4.0 $\pm$ 3.1	11.2 $\pm$ 6.9	7.5 $\pm$ 0.8
9 天	6.0 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 3.6	7.3 $\pm$ 2.7	6.0 $\pm$ 1.0
11 天	5.2 $\pm$ 1.9	5.9 $\pm$ 0.9	8.8 $\pm$ 2.1*	7.0 $\pm$ 1.1
13 天	6.0 $\pm$ 2.1	8.1 $\pm$ 0.7	8.0 $\pm$ 2.6	6.0 $\pm$ 2.3
停药 1 天	3.6 $\pm$ 1.1	10.0 $\pm$ 3.2**	6.7 $\pm$ 1.9*	6.0 $\pm$ 2.4
3 天	4.7 $\pm$ 1.9	11.6 $\pm$ 3.8*	10.1 $\pm$ 3.5*	7.8 $\pm$ 3.2
5 天	4.4 $\pm$ 1.3	8.9 $\pm$ 1.4**	12.2 $\pm$ 4.9*	6.8 $\pm$ 1.9
7 天	6.9 $\pm$ 0.9	10.5 $\pm$ 2.3*	15.1 $\pm$ 7.1	7.3 $\pm$ 3.0
9 天	9.8 $\pm$ 3.3	11.8 $\pm$ 2.1	15.1 $\pm$ 7.2	8.0 $\pm$ 2.2
11 天	15.4 $\pm$ 4.6	12.4 $\pm$ 3.9	15.2 $\pm$ 5.7	7.6 $\pm$ 1.2*
13 天	14.0 $\pm$ 2.2	11.5 $\pm$ 5.1	14.2 $\pm$ 3.9	10.5 $\pm$ 3.1
15 天	9.2 $\pm$ 1.4	13.4 $\pm$ 5.5	13.0 $\pm$ 3.7	10.3 $\pm$ 3.0

注: neumega 为美国 Genetics institute 的已上市重组人白细胞介素 11  
n=4. 与模型对照组相比较。\*P<0.05, \*\*P<0.01

##### 五. 重组人 $\Delta 1-9$ (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物组织分布特性

小鼠 sc 给药 50  $\mu$  g/kg 的重组人 $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物, 0.1ml/20g(含 <sup>125</sup>I-rh $\Delta 1-9$  (ala<sup>10</sup>)IL-11 2.125  $\mu$  Ci/只), 给药后 0.25、2、4、8h 处死动物测组织分布。表(3)结果显示, 在给药后 0.25h, 组织含药量最大, 以后逐渐降低, 放射活性从高到低的顺序为胃、肾、肠、肺、脾、肝、心、脂肪、卵巢、睾丸、肌肉和脑; 给药后 8h, 其分布还是以胃最高, 其次是肠、肾、肝、肺、脾、脂肪, 睾丸和脑中含量最低。

表(3) 小鼠 sc 给药 50  $\mu$ g/kg 的重组人  $\Delta$ 1-9 (ala<sup>10</sup>) 白细胞介素 11 衍生物后  
用 RA 法测得的组织药物含量 (\* $\pm$ S, n=6)

组织 脏器	药 物 含 量 (ng/g)				
	0.25h	1h	2h	4h	8h
心	20.27 $\pm$ 4.52	8.98 $\pm$ 0.48	6.22 $\pm$ 0.56	4.94 $\pm$ 0.38	3.98 $\pm$ 0.40
肝	24.76 $\pm$ 1.39	17.70 $\pm$ 2.28	9.56 $\pm$ 1.35	6.21 $\pm$ 0.83	5.47 $\pm$ 0.56
脾	29.44 $\pm$ 3.58	18.22 $\pm$ 1.16	10.89 $\pm$ 2.92	6.15 $\pm$ 0.34	5.39 $\pm$ 0.58
肺	30.57 $\pm$ 2.83	21.34 $\pm$ 3.54	11.60 $\pm$ 2.30	7.12 $\pm$ 0.61	5.49 $\pm$ 1.10
肾	54.76 $\pm$ 1.48	28.53 $\pm$ 4.13	16.81 $\pm$ 3.19	10.97 $\pm$ 0.94	8.94 $\pm$ 0.42
胃	231.20 $\pm$ 41.48	249.94 $\pm$ 41.03	142.03 $\pm$ 11.86	136.46 $\pm$ 25.69	59.53 $\pm$ 8.11
小肠	32.07 $\pm$ 3.90	31.76 $\pm$ 4.70	14.65 $\pm$ 3.68	8.07 $\pm$ 1.68	10.28 $\pm$ 4.46
肌肉	12.79 $\pm$ 3.15	14.23 $\pm$ 1.54	4.94 $\pm$ 1.62	2.53 $\pm$ 0.37	1.90 $\pm$ 0.36
脑	2.82 $\pm$ 0.05	1.96 $\pm$ 0.15	1.66 $\pm$ 0.65	0.53 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.07
脂肪	16.99 $\pm$ 4.97	10.25 $\pm$ 2.24	4.14 $\pm$ 0.91	2.38 $\pm$ 1.56	1.84 $\pm$ 0.64
卵巢	14.70 $\pm$ 1.10	26.48 $\pm$ 4.62	10.71 $\pm$ 0.31	8.10 $\pm$ 0.19	2.80 $\pm$ 0.09
睾丸	14.22 $\pm$ 1.09	-	5.93 $\pm$ 0.74	4.95 $\pm$ 0.44	0.70 $\pm$ 0.56
血液	61.79 $\pm$ 12.66	37.56 $\pm$ 7.86	22.08 $\pm$ 7.76	9.88 $\pm$ 1.56	10.02 $\pm$ 3.84

#### 实例说明 II

一、重组人  $\Delta$ 1-9 (gly<sup>10</sup>) 白细胞介素 11 衍生物融合表达系统的构建和测序  
根据“实例说明 I”所述, 选用含谷胱甘肽转硫酶 (GST) 的融合表达质粒 pGEX-4T-1 (Pharmacia) 作为构建的载体, 此载体含有凝血酶位点。设计两对 PCR 引物, 即正链: 5' -CT GGT TCC CCA GAC CCT CGG GCC GAG CTG -3', 反链 5' -TTA TCA CAG CCG AGT CTT CAG CAG CAG -3'。以人的白细胞介素 11 全基因 cDNA 为模板, 扩增出的改进型人白细胞介素 11 基因片段与酶切后的 pGEX-4T-1 大片段相连, 转化大肠杆菌 JM105, 筛选出含插入片段的重组子命名为 pGEX-FK-11g (图 2), 经序列分析后可进行融合表达研究。从 pGEX-FK-11g 中用 BamH I 和 Sal I 双酶切下新型改进型人白介素 11 基因片段, 与 pUC-19 经 BamH I 和 Sal I 双酶切后的大片段相连, 用蓝白斑法筛选出重组子, 命名为 pUC-FK-11g。经 AB I 全自动基因测序后得到插入的新型人白介素 11 的基因序列以及相对应的氨基酸序列, 结果分析与设计的完全一致。



## 二. 重组人 $\Delta$ 1-9 (gly<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物的重组表达和制备

同样根据“实例说明 1”所述,含新型改进型人白细胞介素 11 基因的 pGEX-FK-11g 转化大肠杆菌 JM105, 在含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中摇瓶过夜 (37°C, 200rpm), 再按 1: 30 接种含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37°C 培养 3 小时后, 加入 0.5mM IPTG 诱导 4 小时。收集菌体经 SDS-PAGE 电泳分析, 发现含新型人白细胞介素 11 的融合蛋白 GST-FK-11g (44.6KD) 以可溶性表达为主, 表达量占菌体总蛋白的 28%。用 1000ml 发酵液, 离心收集菌体约 15 克, 用 50 mM 磷酸缓冲液 (pH7.8) 含 1% Triton 溶液混悬菌体, 在室温下破菌 20 分钟, 破菌液经超声波处理至无粘稠后离心去沉淀。上清经 Glutathion-Sepharose (Pharmacia) 进行亲和层析纯化, 吸附在柱上的含新型人白细胞介素 11 的融合蛋白, 用人血浆凝血酶 (每克融合蛋白用 5NIH 单位凝血酶) 室温下在位酶切 1 小时。酶切下的重组新型人白细胞介素 11 再经 CM-Sepharose CL-4B 纯化, 最终产物的纯度超过 98%, 热原含量每 mg 蛋白低于 10EU 内毒素。

## 三. 重组人 $\Delta$ 1-9 (gly<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物的理化性质和生物活性

本方法制备的重组人 $\Delta$ 1-9 (gly<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物分子量为 18.2 KD, 等电点大于 10.0, 紫外最大吸收峰为 281nm, 溴化氰肽图分析含有二个甲硫氨酸。氨基酸组成分析与理论设计值一致, 由 169 个氨基酸组成, 其中无半胱氨酸。N 末端测序证实是: Gly Ser Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu, 与设计的重组人 $\Delta$ 1-9 (gly<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物 N 末端序列完全一致。

用依赖于白细胞介素 6 的细胞株 7TD1 和 B911 的 MTT 方法测活, 参照品是美国 Genetics Institute 的缺失脯氨酸的重组人白细胞介素 11 和天然的人白细胞介素 11。测得本方法制备的重组人 $\Delta$ 1-9 (gly<sup>10</sup>)白细胞介素 11 衍生物的比活性分别是  $2.5 \times 10^6$  IU/mg (7TD1 细胞) 和  $8.0 \times 10^6$  IU/mg (B911 细胞), 与天然和缺失脯氨酸的人白细胞介素 11 的比活性完全一致。

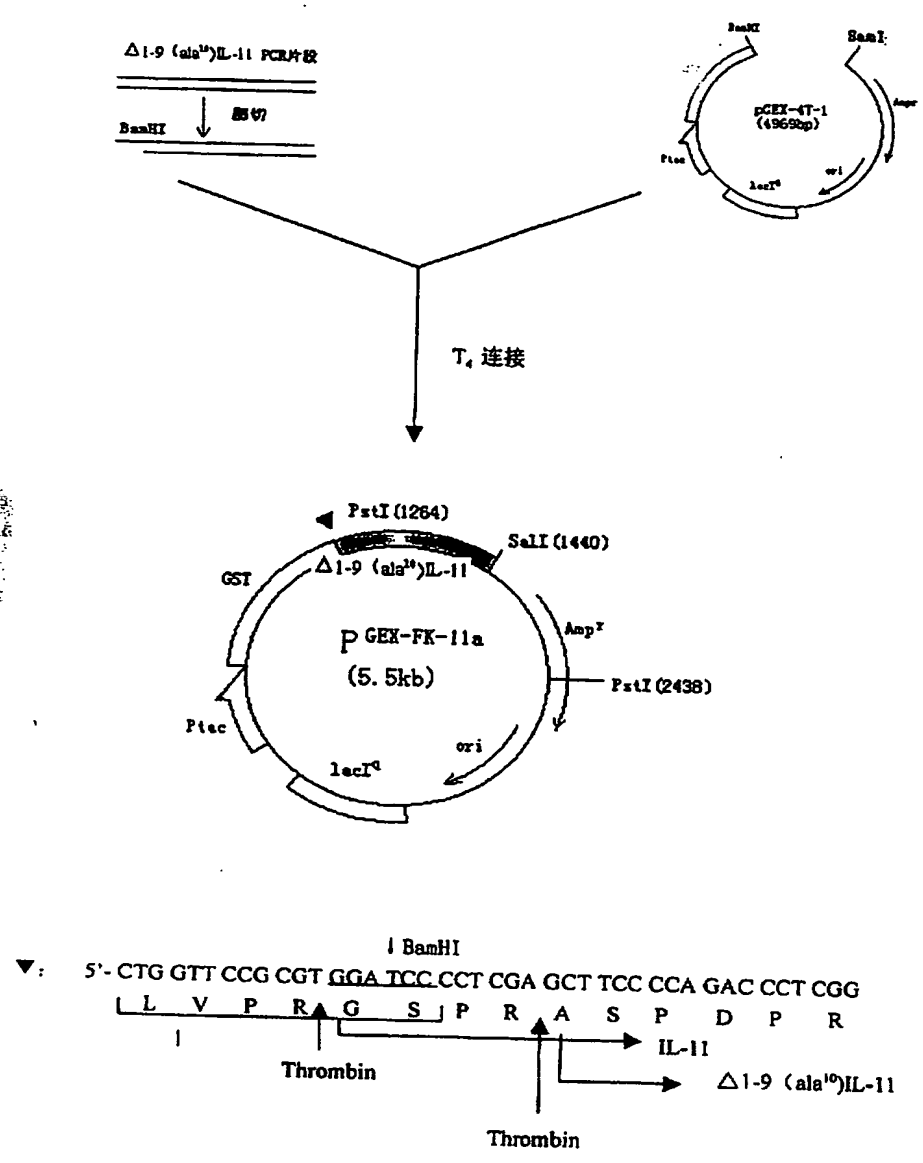


图1 表达质粒 pGEX-FK-11a 构建图

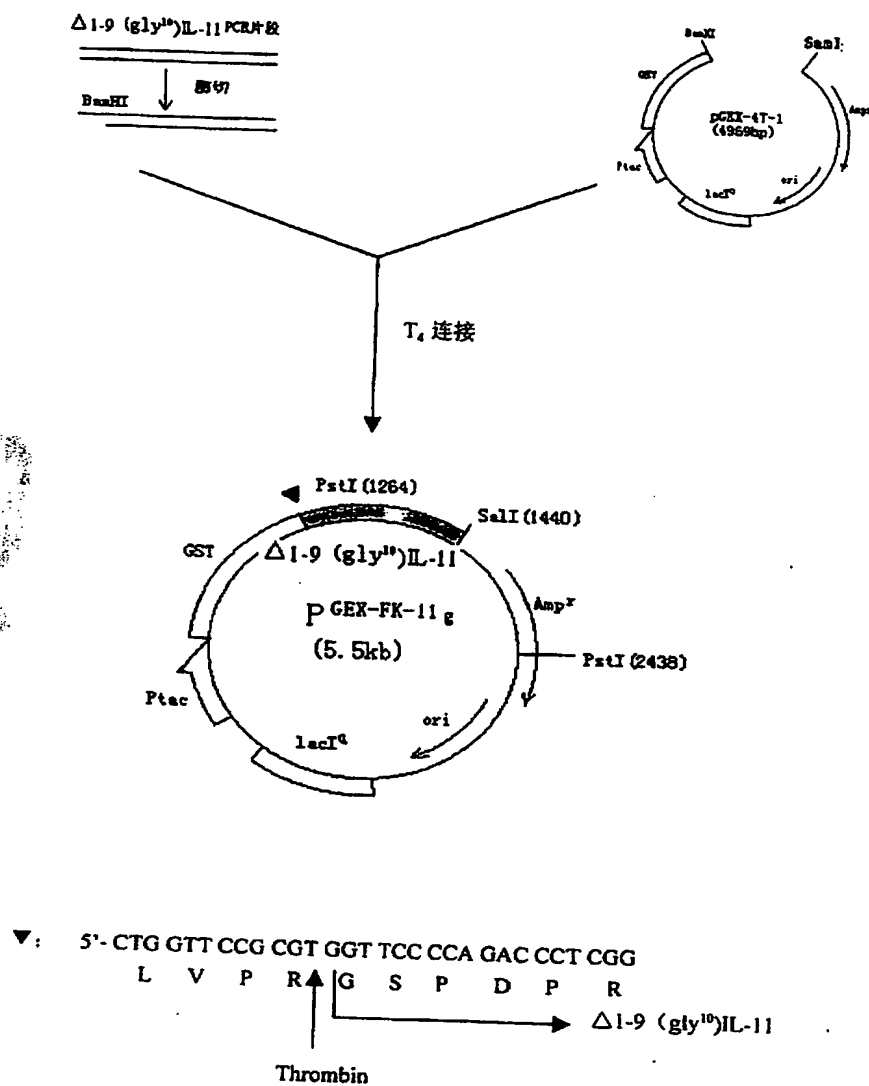


图2 表达质粒 pGEX-FK-11g 构建图